

Einfluss von Östrogen auf die Plasminogen Promotoraktivität

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Louise Kobelt

geboren am 13.01.1985 in Karl-Marx Stadt

angefertigt an der Klinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche der Universität Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr.med. V. Schuster

Dr.rer.nat. Jürgen Klammt

Dr.rer.nat. Katrin Tefs

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

22.11.2016

Inhaltsverzeichnis.....	I
I Bibliografische Beschreibung und Referat.....	II
II Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung und Hintergrund.....	1
1.1. Plasminogen und Typ I Plasminogenmangel.....	1
1.2. Organisation des Plasminogen Gens und des Plasminogen Promotors.....	2
1.3. Östrogen und dessen Signaltransduktion.....	3
2. Überleitung zur Originalpublikation – Fragestellung.....	5
3. Originalpublikation.....	7
4. Diskussion und Ausblick.....	15
5. Zusammenfassung.....	17
6. Literaturverzeichnis.....	19
III Eigenständigkeitserklärung.....	IV
IV Curriculum vitae.....	V
V Liste der Publikationen.....	VI
VI Danksagung.....	VII

I Bibliografische Beschreibung

Louise Kobelt

Einfluss von Östrogen auf die Plasminogen Promotoraktivität

Universität Leipzig, Dissertation

26 Seiten, 78 Literaturangaben

Referat

Der Typ I Plasminogenmangel ist eine seltene Multisystemerkrankung mit einer gestörten extravaskulären Fibrinolyse, die zur Ausbildung fibrinreicher Pseudomembranen auf Schleimhäuten führt. Kausale Therapien existieren bisher nicht, Fallberichte beschreiben jedoch eine Besserung der Symptomatik bei Patientinnen bei Einnahme oraler Kontrazeptiva. Östrogen wirkt im Körper über Rezeptoren durch Beeinflussung der Genexpression an bestimmten regulatorischen Elementen im Bereich der Promotoren (*Estrogen responsive Elements (EREs)*). Dies führte zu der Fragestellung, ob und durch welche Promotorelemente der Plasminogen Promotor durch Östrogen regulierbar und die Genexpression hierdurch modulierbar ist. Hierfür wurden verschiedene Promotorkonstrukte mit und ohne regulatorische Elemente kloniert und mittels *Dual Luciferase Reporter Assay* analysiert. *In silico* wurden 2 *EREs* (-11,5 kb und +4,2 kb relativ zur Transkriptionsstartstelle) identifiziert und anschließend ebenfalls in den Konstrukten getestet. Der kleinste „Plasminogenminimalpromotor“ war nicht durch Östrogen beeinflussbar. Proximale Promotorelemente wie die DNase hypersensitive Region II mit einer beschriebenen *Estrogen Responsive Unit* sowie ein -2,4kb umfassendes Promotorkonstrukt wirkten unter Östrogenstimulation hemmend auf die Promotoraktivität. Ursächlich dafür sind wahrscheinlich weitere Interaktionen des Östrogen Rezeptors mit transkriptionsmodulierenden Proteinen, z.B. sind Interaktionen vermittelt über eine AP-3 Bindungsstelle denkbar. Die hemmenden Effekte konnten als Plasminogen-Gen-spezifisch und Leberzell-spezifisch demonstriert werden. Im Gegensatz dazu lösten beide vor die Minimalpromotoren klonierten *EREs* eine starke Stimulation aus, die sich auch in nichthepatischen Zelllinien - dort jedoch in geringerem Ausmaß - zeigte. Somit sind diese *EREs* starke Enhancer, die eine Leberspezifität aufweisen. Die in der Summe komplexe Regulation der Östrogen-vermittelten Plasminogen Transkriptionskontrolle lässt auf eine Mitwirkung zusätzlicher Faktoren schließen. Um den *in vitro* Effekt der scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse zu untersuchen, wurden humane Leberzellen einer Primärzellkultur mit Östrogen stimuliert und anschließend hinsichtlich der Plasminogen Expression untersucht. Diese Methode ließ sich jedoch aufgrund der Limitierung des Probenmaterials auf Leberbiopsien von Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen mit Lebermetastasierung, damit einhergehend fehlender Östrogenrezeptorexpression, sowie fehlender Plasminogenexpression nicht etablieren, sodass hier der Nachweis des wirklichen Effektes des Östrogeneinflusses nicht gelang.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich der Plasminogen Promotor durch Östrogen regulieren lässt. Der genaue Mechanismus und der *in vitro* Effekt ließ sich jedoch nicht abschließend klären und bedarf weiterer Forschung. Eine vielversprechende Fortführung der Arbeit, besonders im Hinblick auf adäquate Therapieoptionen des Typ I-Plasminogenmangels, wäre die Etablierung eines geeigneten Zellmodells und die Erprobung weiterer Plasminogen modifizierender Substanzen.

II Abkürzungsverzeichnis

AP- 1/3 - Aktivatorprotein 1/3

Apo(a) - Apolipoprotein(a)

bp - Basenpaar

DH - DNase Hypersensitive Region

E2 - 17 β Estradiol

ERE - Estrogen Responsive Element

ERU - Estrogen Responsive Unit

HepG2 - Hepatom Zelllinie G2

hER - human Estrogen Receptor

HNF-1 - hepatocyte nuclear factor 1

kb - Kilobasen

LPS - Lipopolysaccharid

mRNA - messenger Ribonucleic Acid

Plg - Plasminogen

PPAR - peroxisome proliferator-activated receptor

PCR – Polymerase Chain Reaction

Sp1 - Specifity Protein 1

TNF - Tumor Nekrose Faktor

TSS - Transcription Start Site

1. Einleitung und Hintergrund

1.1. Plasminogen und Typ I Plasminogenmangel

Plasminogen (Plg) ist die im Blut zirkulierende Vorstufe von Plasmin, dessen Hauptfunktion die Fibrinolyse, also die Degradierung fibrinreicher Thromben ist (Collen, 1980). Durch verschiedene Oberflächenrezeptoren für Plg und Plasmin an Zellen ist es auch in der Lage, extrazelluläre Matrix zu degradieren. Es spielt somit eine wichtige Rolle bei der Wundheilung, Embryogenese, Angiogenese, aber auch bei Tumorwachstum und –metastasierung (Mak *et al.*, 1976; Strickland *et al.*, 1976; Gross *et al.*, 198; Ossowski *et al.* 1983; Dano *et al.*, 1985; Nielsen *et al.*, 1988; Schäfer *et al.*, 1994).

Die Aktivierung von Plg zu Plasmin erfolgt durch die Spaltung zwischen den Aminosäuren Arginin 561 und Valin 562 und der Abspaltung eines 76-Aminosäure-Fragmentes, des sogenannten Präaktivierungspeptids, vom N-terminalen Ende des Plg. Bei der Plg-Aktivierung unterscheidet man zwischen der physiologischen Aktivierung durch körpereigene Aktivatoren (im Wesentlichen der Gewebs-Plg-Aktivator (tPA) und Urokinase (uPA)) und der nichtphysiologischen Aktivierung durch körperfremde Substanzen wie z. B. Strepto- und Staphylokinase (Collen, 1980).

Die relevantesten Substrate von Plasmin sind Fibrinogen und Fibrin. Fibrinpolymere werden durch Plasmin in lösliche Fibrinabbauprodukte gespalten. Somit verhindert Plasmin ein Überschießen der Blutgerinnung und sorgt für regelgerechtes Ausheilen einer Wunde (Shafer *et al.*, 1988). Plasmin hat eine breite Substratspezifität und kann somit auch andere an der Fibrinolyse und dem primären Wundverschluss beteiligten Proteine wie Fibronectin, Laminin, Kollagen (Hanbücken *et al.* 1987, Juranic *et al.*, 1989), Prekallikrein (Burrowes *et al.*, 1971), Faktor Va (Zeibdawi *et al.*, 2001), Faktor VIII (McKee *et al.*, 1975), TFPI (tissue factor pathway inhibitor) (Li *et al.*, 1998), von Willebrandt Faktor (Hamilton *et al.*, 1985), Thrombospondin (Bonney *et al.*, 2000), pro-MMP9 (pro-Matrixmetalloproteinase-9) (Lijnen, 2001) und Procarboxypeptidase B (Mao *et al.*, 1999) degradieren.

Hauptbildungsort des humanen Plg ist die Leber (Bohmalk *et al.*, 1980). Eine geringe Expression erfolgt in der Niere (Tateno *et al.*, 1999), sowie in der Kornea (Twining *et al.*, 1999) und zu sehr geringen Anteilen in Nebenniere, Hirn, Hoden, Herz, Lunge, Uterus, Milz und Darm (Zhang *et al.*, 2002).

Der Typ I Plg-Mangel ist charakterisiert durch eine gleichermaßen starke Erniedrigung der Plg-Aktivität und der Plg-Konzentration im Plasma (Schuster *et al.*, 2003). Pathophysiologisch handelt es sich um eine fehlerhafte Antwort auf entzündliche Stimuli, die Auslöser für den Ausbruch der Erkrankung sind: Durch das Fehlen von Plg als essentiellm Enzym der Fibrinolyse kommt es nach Auslösung des Wundheilungsprozesses zu einem ungebremsten Fibrinaufbau und der Anreicherung von fibrinreichen Pseudomembranen an Schleimhäuten (Chen *et al.*, 2000). Der häufigste Manifestationsort ist die Bindehaut des Auges (Conjunctivitis lignosa), aber auch alle anderen

Schleimhäute des Körpers wie z. B. das Zahnfleisch, der Respirationstrakt und der weibliche Genitaltrakt können betroffen sein (Chi *et al.*, 2009). Außerdem wurde im Zusammenhang mit dem Typ I Plg-Mangel ein Hydrocephalus occlusus beschrieben. Interessanterweise kommt es nicht gehäuft zu Thrombosen, was bei diesen Patienten für eine intakte intravaskuläre Fibrinolyse spricht. Die genauen Mechanismen hierzu sind jedoch nicht hinreichend geklärt (Tait *et al.*, 1996; Klammt *et al.*, 2011).

Das Manifestationsalter ist meist das erste bis sechste Lebensjahr. Je schwerer die Manifestationsform ist, desto geringer ist oft auch die Lebenserwartung der Betroffenen (Klammt *et al.*, 2010). Ursächlich für die verminderte Serumkonzentration beim Typ I Plg-Mangel ist eine eingeschränkte Sekretion des Genproduktes ins Blut (Tefs *et al.*, 2006). Der Typ I Plg-Mangel wird autosomal rezessiv vererbt, es konnten verschiedene homozygote und compound-heterozygote Mutationen bei Patienten mit Conjunctivitis lignosa identifiziert werden, wobei die Missense-Mutation K19E die häufigste ist (Tefs *et al.*, 2003). Eine klare Genotyp-Phänotyp Korrelation besteht nicht (Klammt *et al.*, 2011). Bis zum heutigen Zeitpunkt sind mehr als 200 Patienten mit Conjunctivitis lignosa und Typ I Plg-Mangel weltweit beschrieben. Die meisten Patienten sind türkischer oder arabischer Abstammung (Klammt *et al.*, 2011). Die therapeutischen Optionen sind limitiert, die operative Versorgung erbringt keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da hierbei ein zusätzlicher Entzündungsreiz gesetzt wird, welcher die Proliferation der Pseudomembranen zusätzlich anregt (Bierly *et al.*, 1994; Rao *et al.*, 1998, Caputo *et al.*, 2008). Therapieversuche mit topisch und systemisch angewandten Kortikosteroiden (z.B. Hydrokortison) oder auch lokal oder systemisch verabreichtem Heparin, Warfarin oder *fresh frozen plasma* führten zu keiner nachhaltigen Besserung (De Cock *et al.* 1995; Heidemann *et al.*, 2003; Rodriguez-Ares *et al.*, 2007; Schuster *et al.*, 2007). Erwartungsgemäß zeigt die Substitution von Plg eine gute Wirkung (systemisch besser als topisch) (Schott *et al.*, 1998), jedoch ist ein rekombinantes Plg für eine systemische Therapie derzeit auf dem Markt nicht verfügbar. In einem klinischen Fallbericht wurde beobachtet, dass es bei zwei Patientinnen, die orale Kontrazeptiva (Östrogen-Gestagen-Pille) einnahmen, zu einem Anstieg der Plg-Konzentration und auch der Plg-Aktivität im Plasma kam. Gleichzeitig verbesserten sich die klinischen Symptome der Betroffenen (Sartori *et al.*, 2003). Daraus würde sich ein vergleichsweise günstiger und relativ nebenwirkungsarmer Therapieansatz, zumindest für erwachsene Patientinnen, ergeben.

1.2. Organisation des Plasminogen Gens und des Plasminogen Promotors

Das Plg-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 6 in der Bande 6q26-6q27 lokalisiert (Murray *et al.*, 1987). Es setzt sich aus 19 Exons und 18 Introns zusammen, die insgesamt 52 kb genomischer DNA umfassen (Petersen *et al.*, 1990). Plg gehört zur Familie der Plg-Apo(a)-Genfamilie, einer Gruppe

von Genen mit großen Homologien bezüglich ihrer Nukleinsäuresequenz. Die Gene für Plg und Apo(a) liegen in einer Kopf-an-Kopf Position eng benachbart und weisen Sequenzhomologien von bis zu 91% auf (Malgaretti *et al.*, 1992). Bisher wurden verschiedene Substanzen beschrieben, die die Plg-Genexpression *in vivo* und *in vitro* regulieren. Regulationsort scheint in allen Fällen der Plg-Promotor zu sein. Nah im Bereich des Startcodons des Plg-Gens finden sich Sequenzen, die durch Akut-Phase-Proteine (Fibrinogen, Haptoglobin, Transferrin) erkannt werden (Fowlkes *et al.*, 1984; Maeda, 1985; Adrian *et al.*, 1986). Weiterhin finden sich Erkennungssequenzen für AP-3 und HNF-1, womit die Leberspezifität der Genexpression generiert wird (Meroni *et al.*, 1996). Auch wurden regulatorische Elemente für Interleukin-6, AP-1, *D site of albumin promoter binding protein* (DBP), *CCAAT-enhancer-binding proteins* (C/EBP), GATA und *cAMP response element-binding protein* (CREB) identifiziert (Kida *et al.*, 1997). Interleukin-6 als Akute-Phase-Protein erhöht die Plg-mRNA Expression *in vivo* und *in vitro* (Bannach *et al.*, 2002). Hydrokortison erhöht die Plg-mRNA Expression um das Vierfache, Hauptinteraktionsort ist hier ein *Glucocorticoid-responsive Element* im Bereich der 5' Region des Plg-Promotors (Jenkins *et al.*, 1997). Andere Substanzen wie LPS und TNF- α sind ebenfalls an der Plg-Genregulation und Expression beteiligt (Waismann, 2003). Außerdem wurde der *retinoic acid-related orphan receptor α* als Regulator der Plg-Gen Expression beschrieben (Chauvet *et al.*, 2011).

Innerhalb der Apo(a)-Plg intergenomischen Region gibt es verschiedene regulatorische Elemente, die bisher in erster Linie hinsichtlich der Apo-(a) Genregulation beschrieben wurden. Bedeutend sind vier DNA hypersensitive Regionen (DH I-IV), welche Gebiete mit verstärkter Transkriptionsaktivität aufgrund einer Häufung regulatorischer Elemente darstellen (Magnaghi *et al.*, 1994). Besonders wichtig für die vorliegende Arbeit war die Region DHII, in welcher eine *ERU* beschrieben wurde, welche als essentiell für die Östrogen vermittelte Regulation des Apo(a)-Promotors identifiziert wurde (Boffelli *et al.*, 1999). DHII wurde dabei als sowohl in 3'-5', als auch 5'-3' Richtung hinsichtlich der Apo(a)-TSS als wirksam beschrieben, somit kann auch eine Regulation des Plg-Promotors vermutet werden.

1.3. Östrogen und dessen Signaltransduktion

Östrogen gehört zu den Steroidhormonen und kann - in mehreren Formen, von denen die potenteste das 17 β Estradiol (E2) ist - endokrin, parakrin und autokrin auf verschiedene Gewebe wirken. Es ist im Wesentlichen für die Ausbildung der sekundären weiblichen Geschlechtsorgane verantwortlich. Wichtige Funktionen sind auch die Mitwirkung am Follikelreifungszyklus und bei der Vasodilatation, womit es eine Rolle bei der Zellproliferation, Inflammation, dem Knochenstoffwechsel, der neuronalen Differenzierung aber auch in der Entstehung von Arteriosklerose und dem Wachstum und der Metastasierung von Karzinomen spielt (Mück *et al.*, 2006). Die Wirkung von Östrogen

mittels spezifischer Rezeptoren (*ERα* und *ERβ*) umfasst einerseits die Transkriptionsaktivierung oder -repression, kann aber auch auf nicht genomischer Ebene über z.B. Aktivierung der Adenylat-Zyklase, der *mitogen-activated protein*-Kinase, sowie der Phosphatidol-Inositol-3-Kinase erfolgen (Cheskis *et al.*, 2007).

Die Östrogen Rezeptoren sind Liganden aktivierte Transkriptionsfaktoren, bestehend aus verschiedenen Strukturdomänen zur Hormonbindung, DNA-Interaktion und Transkriptionsaktivierung. Sie gehören zusammen mit dem Glucokortikoid Rezeptor, den Rezeptoren der Schilddrüsenhormone, dem Vitamin-D3-Rezeptor und den Eicosanoidrezeptoren in die Familie der nukleären Rezeptoren (Klinge, 2001). *ERα* und *ERβ* werden von verschiedenen Genen auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert. Die DNA Bindungsdomäne beider Rezeptoren ist jedoch hoch konserviert. Die Rezeptoren sind im inaktiven Zustand an *Heat Shock* Proteine gebunden und im Zytoplasma lokalisiert. Bindung von z.B. E2 induziert eine Dissoziation vom *Heat Shock* Protein Komplex und führt zu einer Dimerisierung und Bindung als Homo- oder Heterodimer an spezifische DNA-Sequenzen, die *Estrogen Responsive Elements (EREs)* genannt werden. (Klinge, 2001; Krieg *et al.*, 2004). Drei spezifische Aminosäuren innerhalb der sog. P-Box innerhalb des Zink-Fingers des Östrogen Rezeptors binden sequenzspezifisch an ein *ERE*. Der zweite Zinkfinger ist für die Rezeptordimerisierung notwendig. Sowohl *ERα* als auch *ERβ* binden die gleichen Nukleotide am Konsensus *ERE*. *In vitro* Studien haben ergeben, dass die Östrogen Rezeptor Konformation von zwei Faktoren abhängt: dem Liganden und der spezifischen *ERE* Sequenz. Dies resultiert in einer unterschiedlichen Aktivierung von co-regulatorischen Elementen und beeinflusst so die Gentranskription an unterschiedlichen *EREs* (Anolik *et al.*, 1996; Klinge, 2000). Beide Rezeptorsubtypen haben unterschiedliche Affinitäten für unterschiedliche *EREs* und können so verschiedene transkriptionelle Effekte hervorrufen (Klinge, 2001).

EREs sind palindromische DNA-Sequenzen (5'-aGGTCAnnnTGACCT-3'), welche erstmals in den aus dem afrikanischen Klauenfrosch (*Xenopus laevis*) isolierten Genen Vitellogenin A1, A2, B1 und B2 beschrieben wurden. Es handelt sich dabei um ein 13 bp langes Palindrom mit einem 3 unspezifische Nukleotide enthaltenden Platzhalter (Klein-Hitpass *et al.*, 1988). Nur wenige Gene enthalten diese Sequenzen in ihren Promotoren, meist differieren sie um ein oder 2 Nukleotide, ohne dass die Wirksamkeit verloren geht (Berry *et al.*, 1998; Richard *et al.*, 1990). Im humanen Genom enthalten die meisten Östrogen regulierten Gene keine perfekten *EREs*, aber sie haben nicht-palindromische *EREs*, durch welche die Östrogen Wirkung gesteuert wird (Anolik *et al.*, 1996). Bestimmte Voraussetzungen in der Sequenz solcher nicht palindromischen *EREs* wurden *in vitro* bestimmt: Eine besondere Rolle spielen dabei die direkt an ein *ERE* angrenzenden Sequenzen; z. B. ermöglicht eine Purinbase die sich in Position -7 jedes Stranges befindet, eine Bindung des *ERs* wenn im *ERE* 1 bp mutiert ist (Driscoll *et al.*, 1998). Zwei Mutationen können durch eine Purinbase auf Position -7 und

-8 kompensiert werden. Je mehr Nukleotidveränderungen der Konsensussequenz vorliegen, desto schlechter wird die Bindung (Driscoll et al., 1998). Verbessert werden kann sie wiederum durch AT reiche Sequenzen rund um die *EREs* (Anolik et al., 1996). *EREs* können sich in weiten Abständen von der *TSS* befinden und so über lange Strecken wirken. Nur 5% der *EREs* befinden sich innerhalb der proximalen Promotoren (bis 5 kb oberhalb der *TSS*). Die überwiegende Mehrheit ist innerhalb der Introns oder weiter distal gelegener Sequenzen lokalisiert, wodurch die Transkription über weite Distanzen reguliert wird. Hierbei beobachtet man, dass Gene, die durch Östrogen hochreguliert werden, mehr proximale *EREs* enthalten, als solche, die unter Östrogeneinfluss herunterreguliert werden (Kininis et al., 2007). Die Expressionsdynamik der durch *ER* regulierten Gene lässt vermuten, dass Transkriptionsaktivierung durch direkte *ERE-ER* Interaktion zustande kommt, wohingegen die Verminderung der Transkription durch *ER* über indirekte Mechanismen hervorgerufen wird, wie zum Beispiel Bindung und Rekrutierung von *Sp1* und *AP-1* (Lin et al., 2007).

Häufiger als echte *EREs* sind so genannte „estrogen response units“ (*ERU*). Diese bestehen aus unvollständigen palindromischen oder halb-palindromischen Sequenzen, welche manchmal bis zu 100 bp voneinander getrennt sein können. Die Östrogen Antwort wird dann durch Synergismen der verschiedenen Transkriptionselemente hervorgerufen. Man geht davon aus, dass verschiedene Aktivatoren oder Repressoren mittels direkter Interaktion mit *ER* Dimeren oder durch allosterische Modulationen zwischen DNA und *ER* Komplexen zusammen aktiviert werden und so die Transkription beeinflussen können (Beekman et al., 1991). Manchmal schließen sich diese Sequenzen mit anderen hormonresponsiblen Elementen zusammen und bilden so eine multihormonsensible Sequenz (Lee et al., 1995). Für den *ERα* wurde gezeigt, dass er an direkte Wiederholungen des *ERE*-Halbpalindroms binden kann, optimal solche, die 15-20 Nukleotide voneinander entfernt sind (Kato et al., 1995). Ein Gen, das durch eine *ERU* reguliert wird, ist das Apo(a)-Gen (Boffelli et al., 1999). Aufgrund der bereits beschriebenen Kopf-an-Kopf Lage des Plg- und Apo(a)-Gens ist somit eine Regulation des Plg-Gens durch Östrogen wahrscheinlich, daher wurde diese Region, die DHII umfasst, in der vorliegenden Arbeit untersucht.

2. Überleitung zur Originalpublikation - Fragestellung

Der Typ I Plg-Mangel ist eine seltene, aber potentiell lebensbedrohliche Erkrankung mit dem pathologischen Korrelat einer verminderten Plg-Sekretion. Systemische therapeutische Optionen existieren kaum. In einem Fallbericht konnte jedoch gezeigt werden, dass bei zwei erwachsenen Patientinnen mit Typ I Plg-Mangel die Gabe eines oralen Kontrazeptivums zu einem Anstieg der Plg-Konzentration im Blut und einer Besserung der klinischen Symptome führte. Östrogen wirkt in erster Linie durch eine Transkriptionsaktivierung durch direkte Bindung des Rezeptors an spezifische DNA Sequenzen in den Promotoren regulierter Gene und führt somit zur vermehrten oder verminderten

Genexpression. *In vivo* konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Östrogen die Plg-Konzentration im Serum angehoben werden kann (Tchaikovski *et al.*, 2010). Es scheint somit wahrscheinlich, dass dieser Effekt durch eine gesteigerte Transkription und nachfolgend Expression und Sekretion von Plg zu Stande kommt.

Unter diesen Voraussetzungen ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Ist der Plg-Promotor durch Östrogen regulierbar?
2. Welche Promotor- oder/und Enhancer-Elemente des Plg-Gens sind notwendig?
3. Reguliert Östrogen die endogene Plg-Expression?

Um diese Mechanismen genauer zu untersuchen, wurde nach einem geeigneten *in vitro* System gesucht. Plg wird maßgeblich in der Leber synthetisiert, somit schien die immortalisierte Leberkarzinomzelllinie HepG2 ein geeignetes Zellmodell zu sein. Als Methode für die Analyse der Promotoraktivität diente der *Dual Luciferase Assay*, mit welchem unterschiedliche Promotoren mit verschiedenen regulatorischen Elementen hinsichtlich ihrer Aktivität untersucht werden konnten. Hierfür wurden diverse Plg-Promotorfragmente mit und ohne regulatorische Elemente kloniert und mittels *Dual Luciferase Assay* bezüglich ihrer Aktivität untersucht. Um die Ergebnisse der *in vitro* Experimente zu verifizieren, sollte nachfolgend die endogene Plg-Expression in primären humanen Zellen nach Stimulation mit Östrogen mittels *Real-Time-PCR* gemessen werden. Ein humanes Zellmodell mit ausreichend Plg-Expression und gleichzeitig *hERα*-Expression ist bisher nicht beschrieben. In meiner Arbeit verwendete ich eine Primärzellkultur von humanen Leberzellen, die aus Leberbiopsien von Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen mit Lebermetastasierung stammten.

Die Methoden, durchgeführten Arbeiten und Ergebnisse sind in nachfolgender Originalpublikation beschrieben, die im Juli 2013 im Journal *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)* veröffentlicht werden konnte.



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Estrogen modulates plasminogen promoter activity

Louise Kobelt*, Jürgen Klammt¹, Katrin Tefs¹, Volker Schuster¹

Hospital for Children and Adolescents, Centre for Pediatric Research, University of Leipzig, Germany



ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2013

Available online 18 July 2013

Keywords:

Plasminogen
Estrogen
Estrogen receptor
Enhancer element
Promoter
Transcription

ABSTRACT

Postmenopausal women treated with estrogen hormone replacement therapy and female patients with hypoplasminogenemia receiving oral contraceptives show increasing plasminogen (PLG) concentrations. The elevated PLG levels are in contrast to the estrogen dependent decline of lipoprotein(a) [Lp(a)], whose main protein component apolipoprotein(a) [APO(a)] is highly homologous to PLG in protein and gene structure and is also located in its immediate vicinity on chromosome 6q26. The intergenic region between both genes comprises several transcription-regulatory regions with enhancer sequences that increase the basal activity of the PLG core promoter. Using luciferase reporter assays we demonstrate that the minimal PLG promoter is insensitive to estrogen. However, an estrogen response element located 11.5 kb upstream of the PLG transcription start site is able to convey a dramatic estrogen-dependent elevation of PLG-minimal promoter driven reporter gene expression. In contrast, the activating effect of two additional enhancer elements, among them a DNase I hypersensitivity region that has been shown to regulate the APO(a) minimal promoter activity, is abrogated by estrogen. Thus, the identified estrogen-responsive elements provide a gene and tissue specific framework by which PLG expression is regulated and whose activity is orchestrated by yet unknown accessory factors.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Plasminogen (PLG, MIM 173350) is the zymogen of plasmin, the enzyme of fibrin clot degradation. Apart from the involvement in fibrinolysis PLG plays a major role in wound healing, cell migration, tissue remodeling, angiogenesis and embryogenesis and is primarily synthesized by liver tissue [1,2].

The PLG gene is located on chromosome 6q26–q27 [3] and resides in a head-to-head configuration with the APO(a) gene (LPA, MIM 1 52200), from which it is separated by a ~40 kb intergenic region that contains various regulatory elements described to modulate APO(a) promoter activity in reporter gene assays (Fig. 1A) [4–6]. APO(a) is a protein component of the plasma lipoprotein Lp(a) and bears a strong homology to PLG [7,8]. Elevated plasma Lp(a) levels have been identified as an independent risk factor for the development of cardiovascular disease [9].

PLG gene expression is regulated by glucocorticoids, interleukin 6, nerve growth factor, and retinoic acid-related orphan receptor

alpha [10–13]. Furthermore, epidemiological studies revealed an increase of PLG plasma levels in women taking oral contraceptives and in postmenopausal women receiving hormone replacement therapy, containing estrogen alone or in combination with gestagens [14,15].

Estrogen (E2, 17 β -estradiol) acts primarily by binding to the estrogen receptor (ER α , ESR1; ER β , ESR2). The activated ER is a transcription factor that binds in dimeric form to estrogen response elements (EREs) in regulatory regions of target genes. Only few genes with canonical EREs are known. Most E2 target genes do not contain a perfect ERE palindrome but have non-palindromic, imperfect EREs through which modulation of promoter activity has been demonstrated [16,17].

In this study we addressed the influence of E2 on the PLG promoter and adjacent regulatory elements. In PLG expressing HepG2 cells we analyzed *cis*-acting sequences and elements previously shown to play a role in APO(a) gene expression. Moreover, we identified two EREs that influence PLG promoter activity to various extent *in vitro* suggesting that the plasminogen gene is a target for estrogen action.

2. Material and methods

2.1. Plasmids

All PLG promoter and enhancer constructs were cloned into the pGL4.10 reporter vector (Promega, Madison, WI, USA) encoding the *Photinus pyralis* (firefly) luciferase. Positional information within

Abbreviations: APO(a), apolipoprotein(a); DH, DNase hypersensitivity; ERE, estrogen-response element; Lp(a), lipoprotein(a); PLG, plasminogen; TSS, transcription start site.

* Corresponding author. Address: University of Leipzig, Hospital for Children and Adolescents, Centre for Pediatric Research, Liebigstrasse 20a, 04103 Leipzig, Germany. Fax: +49 341 9726009.

E-mail addresses: louise.kobelt@medizin.uni-leipzig.de (L. Kobelt), juergen-klammt@medizin.uni-leipzig.de (J. Klammt), KatrinTefs@web.de (K. Tefs), volker.schuster@medizin.uni-leipzig.de (V. Schuster).

¹ Address: University of Leipzig, Hospital for Children and Adolescents, Centre for Pediatric Research, Liebigstrasse 21, 04103 Leipzig, Germany.

0006-291X/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.035>

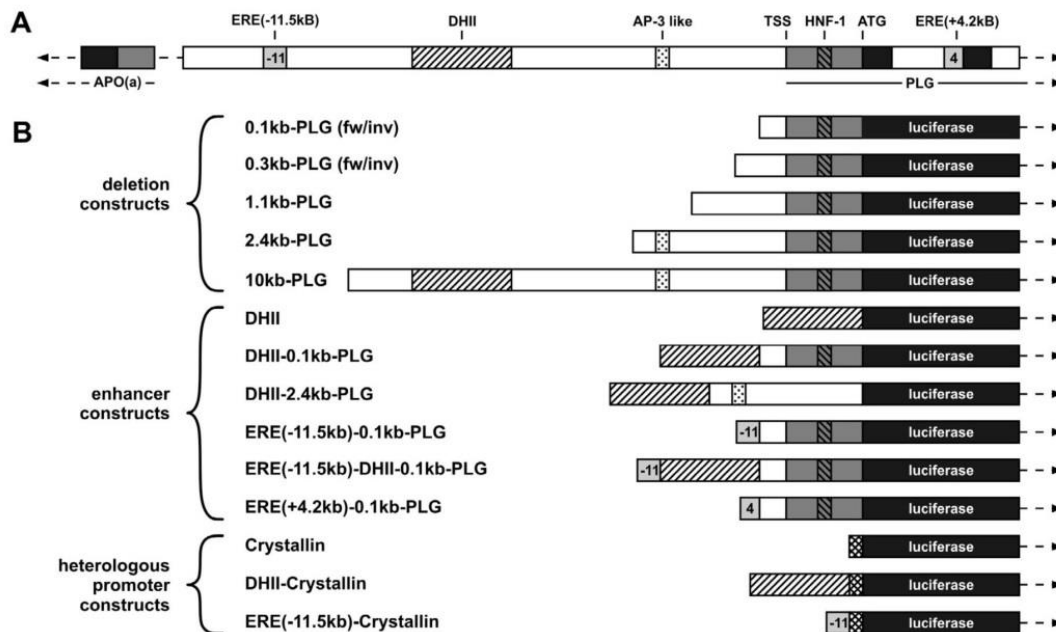


Fig. 1. Organization of the APO(a)-PLG chromosomal locus and plasmid constructs used in this study. (A) Genomic organization of APO(a)-PLG intergenic region on chromosome 6q26 (not drawn to scale). Black bars, exons; shaded bars, 5'-untranslated region (UTR); white bars, introns and intergenic region; hatched and dotted boxes, regulatory elements; light-gray boxes, estrogen response elements (ERE); cross-hatched box, crystallin minimal promoter; TSS, transcription start site according to Malgaretti et al. 1990 [18]; ATG, translation start site; DHII, DNase I hypersensitivity region II [22]; AP3-like, activator protein 3-like; HNF-1, hepatocyte nuclear factor 1; ERE, estrogen response elements. (B) Overview on all promoter and enhancer constructs in the pGL4.10 luciferase reporter vector backbone.

plasmid names refer to the transcription start site (TSS) as defined by Malgaretti et al. [18]. An overview on all used constructs is given in Fig. 1. Detailed cloning strategies for the specific plasmids are described in the Supplementary Material.

For *in silico* analysis to identify potential EREs within the APO(a)-PLG locus the publicly accessible version of MatInspector (Genomatix, Munich, Germany) was used. Double stranded oligonucleotides consisting of synthetic 5'-phosphorylated oligonucleotides corresponding to 25 base pairs around the SmaI restriction site at positions -11502 [ERE(-11.5 kb)] and around the intron 1/exon 2 boundary at position +4263 [ERE(+4.2 kb)] and their corresponding complementary counterparts were generated and cloned into pGL4.10 and specific PLG promoter and enhancer derivatives. Oligonucleotide sequences and cloning strategies are given in the Supplementary Material.

The human ER α (hER α) cDNA pSG5 plasmid was kindly provided by M. Marino (University of Rome, Italy). For transfection assays hER α cDNA was subcloned into the EcoRI sites of the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) (pcDNA3.1-hER α). Expression of hER α in transiently transfected HepG2 cells was verified by immunoblot analysis (mouse-anti-hER α antibody, sc-8005, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

2.2. Cell culture, transfection and Dual Luciferase Assays

The human hepatoma cell line HepG2 and breast cancer cell line MCF-7 were maintained under standard conditions in RPMI 1640 and DMEM-F12, respectively.

For transfection assays 5×10^5 HepG2 cells/well or 2.5×10^5 MCF-7 cells/well, were seeded in 6-well plates in medium without phenol red, supplemented with 5% charcoal/dextran treated fetal bovine serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Briefly, 2.5 μ g of reporter constructs were co-transfected with 0.25 μ g pGL4.70 (encoding the Renilla-Luciferase cDNA as an inter-

nal control; Promega), and 0.2 μ g of expression plasmid pcDNA3.1-hER α using Lipofectamin 2000 (Life Technologies, Paisley, UK). Stimulation experiments were performed in fresh medium containing either 100 nM 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) in ethanol or ethanol alone as vehicle control at a final concentration of 0.01%. After 24 h of incubation, lysates were assayed for luciferase activity using the Dual Luciferase Reporter Assay (Promega) following the manufacturers protocol. In order to normalize for transfection efficiency, luciferase activities are reported as the ratio of the reporter plasmid (pGL4.10) to control plasmid (pGL4.70) activity. In addition, activity of PLG promoter constructs is further normalized to promoter-less pGL4.10 activity.

Primary human hepatocytes were isolated from liver biopsies (3 patients with gastrointestinal malignancies with liver metastases), kindly provided by Prof. R. Gebhardt (Institute for Biochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig, Germany) through the "HepatoSys" program according to the guidelines of the "Charitable state controlled foundation HCR (Human Tissue and Cell Research)" with written informed consent of patients [19]. Culture, stimulation and real time PCR protocols are described in detail in the Supplementary Material.

2.3. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicates. Statistical analyses were performed using students *t*-test. Data are shown as means \pm SEM.

3. Results and discussion

3.1. Effect of E2 on PLG minimal promoters

To verify and compare transcriptional activities under conditions employed in the present study, three minimal promoters

of differing length driving PLG expression [0.1 kb-PLG, 0.3 kb-PLG, and 1.1 kb-PLG (Fig. 1)] described previously were tested. After co-transfection with hER α into HepG2 cells, all core promoters in their native orientation were able to drive luciferase activity 2–3-fold above the promoterless plasmid, whereas 0.1 kb-PLG and 0.3 kb-PLG minimal promoters in antisense direction were not effective (Fig. 2A). These results confirm previous studies, that demonstrated constitutive expression of PLG depending on the presence and orientation of a hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 α (HNF1A) binding site within the PLG 5'-UTR. HNF1 α is a liver enriched transcription factor that binds to DNA sequences near the TSS (between +48 and +61 relative to PLG TSS) [20], a region that is included in three minimal promoter constructs.

When 17 β -estradiol (E2, 100 nM) was administered to transfected HepG2 cells none of the minimal promoter constructs showed a significant modulation of transcriptional activity (Fig. 2A). For further analysis of PLG regulatory elements the 0.1-PLG minimal promoter was used because it was sufficient to mediate basal PLG transcription.

An AP3-like (activator protein 3) enhancer element, located –2.4 kb upstream of PLG-TSS, is involved in PLG transcriptional regulation [20]. In our study we could show that a construct comprising the entire upstream region, containing the AP3 response element (2.4 kb-PLG) was able to further elevate basal luciferase activity 1.7-fold above that of PLG minimal promoters (Fig. 2A). The observed increase corresponds well to previously published results [20] and the 2.4 kb-PLG construct represents the most active contiguous promoter fragment analysed in this study. Surprisingly, with E2 stimulation this effect decreased by 54% down to the activity level of the PLG core promoter, although no ERE could be identified within this region. The identity of an activator protein that in HepG2 cells constitutively binds to a sequence between –2.4 kb and –1.1 kb but whose activity is completely suppressed by estrogen remains elusive. The poorly defined liver enriched AP3 transcription factor might represent a candidate. To the best of our knowledge functional interference of AP3 with activated ERs has never been described.

3.2. Modulation of PLG promoter activity by a DNase hypersensitivity region

Within the PLG-APO(a) intergenic region, four liver specific DNase hypersensitivity regions (designated as DHI-IV) were identified [21].

DHII (–8767 to –9506 bp) was described to enhance APO(a) gene expression [4–6,22]. An ERU (minimal estrogen responsive unit) was identified within DHII containing parts of an ERE, responsible for E2 dependent inhibition of APO(a) expression [4,5]. When DHII was cloned in the same orientation as the PLG gene (i.e., as organized at the chromosomal locus) in front of 0.1-PLG minimal promoter, reporter activity increased 3-fold above the 0.1-PLG minimal promoter without DHII. Following E2 treatment a decrease in activity of 49% was detected (Fig. 2B). Since HepG2 cells do not express detectable levels of endogenous ER α , the E2 responsiveness of the DHII region in front of the PLG minimal promoter was dependent on the presence of co-transfected hER α (data not shown). This mode of DHII action is almost identical to the findings reported for the DHII-estrogen interaction within the APO(a) promoter [4,6].

Neither basal nor E2 dependent activation of the larger 2.4 kb-PLG promoter were affected by the presence of the DHII enhancer (Fig. 2B) suggesting a dominant impact of the putative AP3-like factor binding enhancer element centered at nucleotide –2200 bp (e.g., by blocking access of the DHII bound protein to another accessory *trans*-acting factor) [20].

In order to analyse the estrogen response of the DHII and –2.4 kb regulatory elements in a native context, a fragment containing 10 kb of the PLG-APO(a) intergenic region was cloned into pGL4.10. Under treatment with E2 a significant reduction (52%) of luciferase expression was detected, which points to an inhibitory E2 dependent net effect in the 10 kb upstream promoter region on PLG expression (Fig. 2B). This estrogen dependent decrease parallels the decline observed for the 2.4 kb- and DHII-fragments alone or in combination. Overall activity did not reach pGL4.10 level, which is probably caused by the extensive size of this plasmid supposed to result in a low transfection efficiency.

3.3. Identification and activity of distal estrogen responsive elements (EREs)

To evaluate whether additional putative EREs are located within the 40 kb APO(a)-PLG intergenic region as well as in the region downstream of the PLG transcription initiation site comprising the 5'-untranslated region and the first two exons/introns, *in silico* analysis was performed. Within the upstream intergenic region five out of six identified EREs were excluded from further analyses due to more than one mismatch compared to the canonical 13 bp ERE palindrome (5'-GGTCAnnnTGACC-3') or a spacer length between the ERE half-sites other than the obligatory three nucleotides.

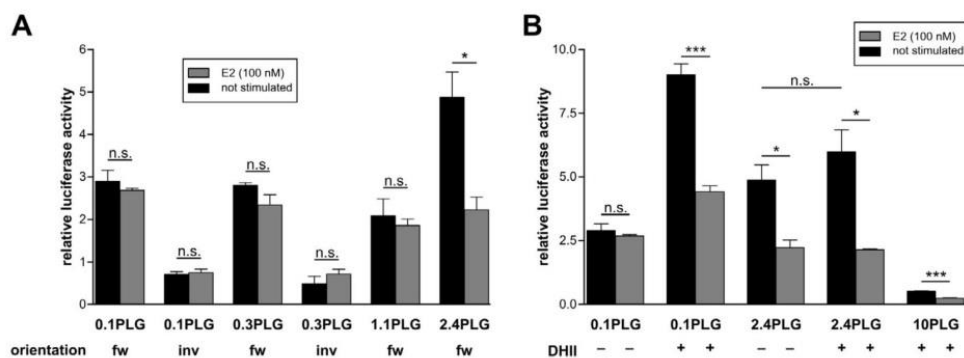


Fig. 2. Basal activity and E2 response of PLG promoter and enhancer constructs. HepG2 cells were transfected and stimulated as described. Plasmids as shown in Fig. 1; 'inv', inverse; 'fw', forward (native) orientation of the indicated core promoters. Transcriptional activities were normalized to pGL4.70 Renilla luciferase activity and expressed relative to pGL4.10 vector only control. All experiments were performed in triplicates and are shown as means \pm SEM. *P* values **p* < 0.05, ***p* < 0.005, ****p* < 0.001.

tides [16,17]. The remaining putative ERE [ERE(−11.5 kb)] resides approximately 11.5 kb upstream of the PLG transcription start site. It corresponds to the canonical 13 bp palindrome apart from one deviation at the third position within the left half-site of the palindrome (Fig. 3A). Interestingly, the adjacent three residues at either half-site extend the (imperfect) palindrome to 19 bp. In addition, 4 nucleotides upstream of the palindrome resides a second ERE half-site forming a perfect direct repeat with the right half-site of the palindrome separated by a 12 bp spacer (Fig. 3A). Extension of the ERE palindrome has been shown to increase ER α affinity; direct repeats of an ERE half-site may provide an additional ER binding target (reviewed in [17]). The ERE(−11.5 kb) element maps to a cluster of putative *cis*-regulatory sequences encompassing approximately 1600 bp within the APO(a)-PLG intergenic region that was previously identified by a modified PCR-electromobility shift assay (EMSA) multistep selection technique [23]. The location of the ERE within a region of increased regulatory activity provides an indication for the functional relevance of the identified sequence.

Within the region downstream the transcription start site only one putative ERE [ERE(+4.2 kb)] was identified and included in the *in vitro* analysis. ERE(+4.2 kb) locates about 4.200 bp downstream the TSS at the intron 1/exon 2 boundary and represents an imperfect palindrome because of two aberrations from the consensus sequence within the right half-site (Fig. 3A).

Both EREs in front of 0.1 kb-PLG in sense and antisense orientation were not able to modify basal luciferase expression. In contrast, under the influence of E2 ERE(−11.5 kb)–0.1 kb-PLG showed a massive 170-fold increase of luciferase activity in forward orientation (Fig. 3B). According to a comprehensive overview given by C.M. Klinge the observed estrogen caused increase in reporter activity is the most dramatic ever reported (note: assays using 10 nM E2 are mainly compared in this review) [17]. It is tempting to assume that the magnitude of the activation results from the remarkable structure of ERE(−11.5 kb); however, if the exact mechanism relies on high affinity, the synergistic action of more than one ER α molecules bound to the expanded response element, or a combination of both mechanisms remains to be clarified in detail. A weaker effect was observed using an inverse construct (43.1-fold increase of activity) (Fig. 3B).

ERE(+4.2 kb) in forward orientation in front of 0.1 kb-PLG displayed a small but significant E2 response (2.19-fold). In inverse orientation it was not able to increase luciferase activity under E2 treatment compared to the unstimulated control (Fig. 3B).

3.4. Interaction of estrogen responsive PLG enhancer elements

We studied the regulatory interplay of both estrogen responsive units, DHII region and ERE(−11.5 kb), by inserting ERE(−11.5 kb) in front of DHII-0.1 kb-PLG. The presence of the ERE(−11.5 kb) decreased the basal, unstimulated luciferase activity compared to DHII-0.1 kb-PLG alone by approximately two-thirds (Fig. 3C) overriding the activating effect of the DHII unit on the PLG minimal promoter. Whereas stimulation of the ERE(−11.5 kb)–0.1 kb-PLG construct with E2 lead to a massive increase in reporter activity the stimulatory effect of ERE(−11.5 kb) was completely abrogated in combination with DHII (Fig. 3C). This mutual suppressive action of the combination of the two response units (separated by about 2000 bp on gene level or 100 bp in our construct) is opposed to the transcriptional synergism that was reported for two to four ERE tandem copies (reviewed in [17]). The functional implications and underlying mechanisms of the ERU/ER α /estrogen interaction conferred by the DHII region have been intensely studied but results are partly conflicting [4,5]. These investigations indicated that the *modus operandi* is determined by additional nuclear receptors with the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α probably playing a role as described in previous studies with APO(a) gene enhancers [5]. Our results obtained from analyses of the DHII-ERE(−11.5 kb) and DHII–2.4 kb interrelationship corroborate the assumption of a contribution of accessory molecules such as coactivators and/or corepressors that mediate a tightly controlled E2 response.

3.5. Enhancer elements are PLG promoter and liver cell specific

As described above the exact mechanism mediating the dramatic estrogen response of the ERE(−11.5 kb) sequence is unknown. Assays shown in Fig. 4A indicate that interaction of the distal ERE element with factors bound to the PLG minimal promoter mediate a large fraction of the E2 dependent increase, since replacement of the PLG gene specific minimal promoter by the heterologous chicken δ -crystallin promoter results in a about 20-fold lower response to estrogen (170-fold versus 8.4-fold, compare Fig. 3b and Fig. 4a). As a proof of functionality the crystallin minimal promoter induced reporter expression about fourfold in HepG2 cells, an effect that was not modified by estrogen (Fig. 4A). Thus, the enormous enhancer potential of ERE(−11.5 kb) results from its exceptional structure and interaction with PLG-specific *trans*-acting factors.

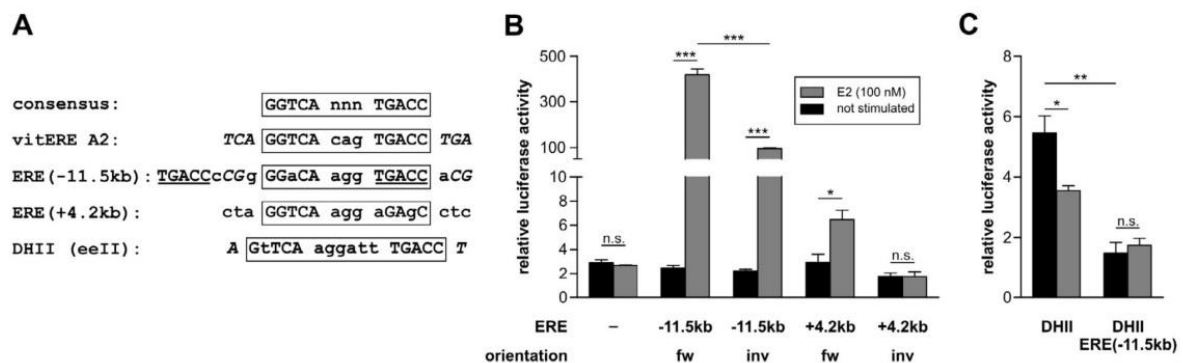


Fig. 3. Structure as well as basal and E2 induced activity of identified estrogen response elements. (A) Sequence of identified EREs (−11.5 kb and +4.2 kb) aligned to the minimal 13 bp ERE consensus palindrome (boxed; n = any nucleotide) derived from African clawed frog *Xenopus laevis* genes encoding vitellogenin isoforms exemplified by vitellogenin A2 (vitERE A2) [16]. DHII (eeII) represents the imperfect ERE palindrome suggested to be responsible for E2 dependent regulation of the APO(a) promoter [4,5]. Note the atypical 6 bp spacer between the ERE half sites. Lower-case characters within ERE half sites indicate nucleotides that deviate from the consensus sequence. Extensions of the 13 bp palindrome are shown in italic letters. Direct repeat sequences within ERE(−11.5 kb) are underlined. (B) and (C) HepG2 cells were transfected and assayed as described for Fig. 2. Estrogen dependent activation of the PLG minimal promoter (0.1 kb-PLG) driven reporter expression by the indicated ERE enhancers cloned in forward (fw) and inverse (inv) orientation (panel b) and in combination with the estrogen responsive DHII fragment (panel c).

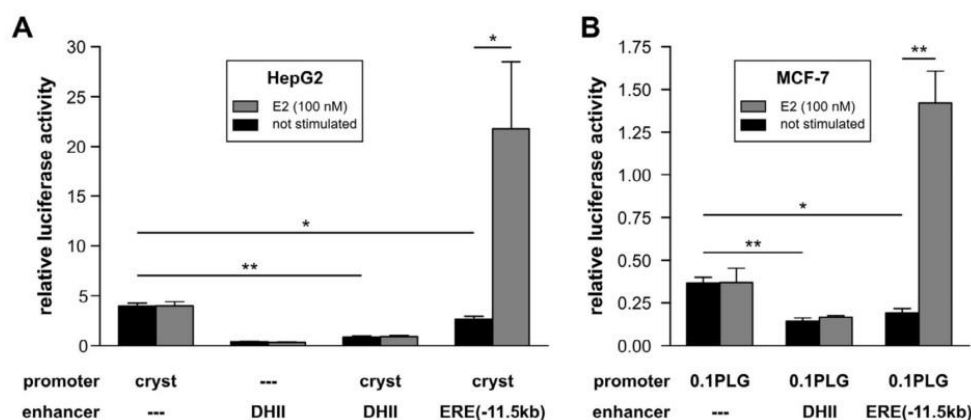


Fig. 4. Promoter- and cell specificity of PLG enhancer elements. HepG2 cells were transfected and assayed as described for Fig. 2. (A) Transcriptional effect of the DHII and/or ERE (–11.5 kb) enhancers on the heterologous crystallin promoter (cryst) driven luciferase activity in HepG2. (B) Estrogen dependent response of the PLG minimal promoter driven reporter expression and the influence of enhancer elements in MCF-7 cells.

Furthermore, the ligand-independent stimulatory action of the DHII sequence unit was dependent on the PLG minimal promoter context: subcloning of DHII either alone or in front of the heterologous chicken δ -crystallin promoter into pGL4.10 had a suppressing effect (Fig. 4A) indicating that DHII does not exert promoter activity on its own and requires the PLG context to act as an enhancer. DHII alone as well as the combined DHII-Crystallin construct were not responsive to E2. Lacking or diminished enhancer activity of the DHII region has also been demonstrated for the heterologous SV40 and – partially – the low density lipoprotein (LDL) receptor [6].

The dramatic ERE(–11.5 kb) mediated E2 triggered transcription activation was not only dependent on interaction with PLG specific *cis*-regulatory promoter elements but also on liver specific *trans*-acting factors as demonstrated by transfection experiments in MCF-7 cells. In this breast carcinoma cell line the PLG minimal promoter was not active; i.e., reporter expression did not even reach the level of the empty reporter plasmid (Fig. 4B) thus confirming liver-specificity shown for the PLG and the APO(a) minimal promoters [10,24]. Neither presence of ERE(–11.5 kb) nor DHII in front of the PLG minimal promoter lead to a basal or E2-stimulated luciferase expression level in MCF-7 cells comparable to those observed in liver-derived HepG2 cells (Fig. 4B).

3.6. Influence of E2 on PLG mRNA expression

The opposing regulation of the PLG promoter by distinct enhancer elements in the co-transfection assays led us to the question in which way endogenous PLG mRNA is regulated in the HepG2 cell model. Therefore HepG2 cells were transfected with hER α and after 24 h of stimulation with E2 PLG expression was quantified by real-time (RT) PCR. RT-PCR revealed that HepG2 cells produced only low amounts of PLG mRNA barely above the detection limit and no regulation by E2 was detected/observed (data not shown).

As HepG2 cells did not appear to be an appropriate cell model for the analysis of endogenous PLG mRNA regulation, human primary hepatocyte culture was established and studied. Liver cells of three patients, suffering from gastrointestinal malignancy with liver metastases, were treated as described in Materials and methods and RT-PCR was performed. We could detect an adequate PLG production, but, again, no regulation by E2 (data not shown). Liver cells are described to express hER α [25], but as the donors of the liver cells were about 60 years old and had a history of cancer, the state of receptor expression was unknown. Using PCR for hER α only weak signals of the receptor mRNA were detected (data

not shown). Western blotting employing a specific hER α antibody revealed no protein expression in the two female patients tested. ER α protein expression in samples from the male patient was not analyzed due to insufficient material. Thus, a primary cell model with proven endogenous expression of both plasminogen and ER α was not available and E2 dependent regulation of PLG expression could not be assessed.

In summary we demonstrated that estrogen regulates plasminogen promoter activity. The 5'-flanking region of the PLG gene contains several *cis*-acting elements that are responsive to estrogen. An enhancer located at –11.5 kb confers a dramatic estrogen response in reporter assays. Estrogen action is PLG gene and liver tissue specific. The estrogen mediated net effect *in vitro* strongly suggests a complex regulation *in vivo*. The regulatory network centered around the ERs depends on a plethora of interacting nuclear factors: Other members of the nuclear receptor super family, auxiliary co-activators and co-repressors that might be active in liver cells but not HepG2 cells. This indirect action of the ER is supported by the observation of PLG minimal promoter dependency, hence *bona fide* enhancers convey their stimulatory signal on any accessible promoter in their proximity. Moreover, the multifaceted extra-nuclear actions of estrogen might play a role [26], possibly by modifying PLG release from E2 responding cell populations by posttranscriptional mechanisms. As an additional level of complexity, in the physiological whole-body situation estrogen effects on PLG expression might be modulated by other hormonal factors that represent themselves targets of estrogen control. Up to now no appropriate human liver cell model is available to assess the net effect of estrogen on PLG protein expression. Such model would be essential to investigate further therapeutical approaches for patients with PLG deficiency type I, a rare autosomal recessive disorder resulting in a life threatening reduction of PLG expression and activity [27].

Acknowledgment

We wish to thank Prof. M. Marino (University of Rome, Rome, Italy) and Dr. H. Sasaki (Osaka University, Osaka, Japan) for kindly providing human ER α (hER α) cDNA pSG5 and chicken δ -crystallin promoter plasmids. Furthermore we thank Prof. R. Gebhardt (Institute for Biochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig, Germany) who provided human hepatocytes through the "HepatoSys" program. Our work was supported by "Promotionsförderung Leipzig" (Leipzig Medical Faculty 2007/2008).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.07.035>.

References

- [1] F.J. Castellino, V.A. Ploplis, Structure and function of the plasminogen/plasmin system, *Thromb. Haemost.* 93 (2005) 647–654.
- [2] D. Raum, D. Marcus, C.A. Alper, et al., Synthesis of human plasminogen by the liver, *Science* 208 (1980) 1036–1037.
- [3] T.E. Petersen, M.R. Martzen, A. Ichinose, et al., Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 6104–6111.
- [4] D. Boffelli, D.A. Zajchowski, Z. Yang, et al., Estrogen modulation of apolipoprotein(a) expression. Identification of a regulatory element, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 15569–15574.
- [5] L.H. Puckey, B.L. Knight, Interaction of oestrogen and peroxisome proliferator-activated receptors with apolipoprotein(a) gene enhancers, *Biochem. J.* 366 (2002) 157–163.
- [6] D.P. Wade, L.H. Puckey, B.L. Knight, et al., Characterization of multiple enhancer regions upstream of the apolipoprotein(a) gene, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 30387–30399.
- [7] J.W. McLean, J.E. Tomlinson, W.J. Kuang, et al., CDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen, *Nature* 330 (1987) 132–137.
- [8] A.M. Scanu, Lp(a) lipoprotein—coping with heterogeneity, *N. Engl. J. Med.* 349 (2003) 2089–2090.
- [9] J.B. Dube, M.B. Boffa, R.A. Hegele, et al., Lipoprotein(a): more interesting than ever after 50 years, *Curr. Opin. Lipidol.* 23 (2012) 133–140.
- [10] F.G. Bannach, A. Gutierrez, B.J. Fowler, et al., Localization of regulatory elements mediating constitutive and cytokine-stimulated plasminogen gene expression, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 38579–38588.
- [11] C. Chauvet, A. Vanhoutteghem, C. Duhem, et al., Control of gene expression by the retinoic acid-related orphan receptor alpha in HepG2 human hepatoma cells, *PLoS One* 6 (2011) e22545.
- [12] A. Gutierrez-Fernandez, R.J. Parmer, L.A. Miles, Plasminogen gene expression is regulated by nerve growth factor, *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 1715–1725.
- [13] G.R. Jenkins, D. Seiffert, R.J. Parmer, et al., Regulation of plasminogen gene expression by interleukin-6, *Blood* 89 (1997) 2394–2403.
- [14] N. Acs, Z. Vajo, Z. Miklos, et al., The effects of postmenopausal hormone replacement therapy on hemostatic variables: a meta-analysis of 46 studies, *Gynecol. Endocrinol.* 16 (2002) 335–346.
- [15] S.N. Tchaikovski, J. Rosing, Mechanisms of estrogen-induced venous thromboembolism, *Thromb. Res.* 126 (2010) 5–11.
- [16] C.J. Gruber, D.M. Gruber, I.M. Gruber, et al., Anatomy of the estrogen response element, *Trends Endocrinol. Metab.* 15 (2004) 73–78.
- [17] C.M. Klinge, Estrogen receptor interaction with estrogen response elements, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 2905–2919.
- [18] N. Malgaretti, L. Bruno, M. Pontoglio, et al., Definition of the transcription initiation site of human plasminogen gene in liver and non hepatic cell lines, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (1990) 1013–1018.
- [19] W.E. Thasler, T.S. Weiss, K. Schillhorn, et al., Charitable state-controlled foundation human tissue and cell research: Ethic and legal aspects in the supply of surgically removed human tissue for research in the academic and commercial sector in Germany, *Cell Tissue Bank* 4 (2003) 49–56.
- [20] G. Meroni, G. Buraggi, R. Mantovani, et al., Motifs resembling hepatocyte nuclear factor 1 and activator protein 3 mediate the tissue specificity of the human plasminogen gene, *Eur. J. Biochem.* 236 (1996) 373–382.
- [21] P. Magnaghi, A. Mihalich, R. Taramelli, Several liver specific DNase hypersensitive sites are present in the intergenic region separating human plasminogen and apoprotein(A) genes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205 (1994) 930–935.
- [22] F. Acquati, V. Ronicke, R. Taramelli, et al., Reporter gene analysis of four DNaseI hypersensitive sites in the plasminogen/apolipoprotein(a) intergenic region, *Clin. Genet.* 52 (1997) 303–307.
- [23] X. Lv, H.Z. Shi, D.P. Liu, et al., High fidelity screening of regulatory sequences in apolipoprotein(a)-plasminogen cluster, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37 (2005) 1846–1857.
- [24] D.P. Wade, G.E. Lindahl, R.M. Lawn, Apolipoprotein(a) gene transcription is regulated by liver-enriched trans-acting factor hepatocyte nuclear factor 1 alpha, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 19757–19765.
- [25] M.J. Duffy, G.J. Duffy, Estradiol receptors in human liver, *J. Steroid Biochem.* 9 (1978) 233–235.
- [26] E.R. Levin, Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 1951–1959.
- [27] J. Klammt, L. Kobelt, D. Aktas, et al., Identification of three novel plasminogen (PLG) gene mutations in a series of 23 patients with low PLG activity, *Thromb. Haemost.* 105 (2011) 454–460.

Supplementary Material der Publikation (online verfügbar)

Materials and Methods

Reporter plasmids. Restriction endonucleases and other nucleic acid modifying enzymes were from NEB (New England Biolabs, Ipswich, MA) and Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA).

Initial polymerase chain reaction using human genomic DNA and a touch-down protocol (HighFid Expand Long PCR system; Roche Deutschland Holding, Mannheim, Germany) was performed to produce a large PLG promoter region fragment (10 kb-PLG) covering the transcription start site (TSS, as defined by Margaretti et al. 1990 [1]) and a 10 kb upstream region as a template for further cloning. The resulting PCR product was cloned into pCR-XL-TOPO-Vector (Life Technologies, Paisley, UK) and further subcloned into the pGL4.10 reporter plasmid (Promega, Madison, WI) encoding the *Photinus pyralis* (firefly) luciferase open reading frame (pGL4.10-10kb-PLG).

Constructs pGL4.10-1.1kb-PLG (-916 bp to +155 bp relative to TSS [2]), pGL4.10-0.3kb-PLG (-283 bp to +155 bp) and pGL4.10-2.4kb-PLG (-2388 bp to +155 bp) [3], as well as pGL4.10-0.1kb-PLG (-63 bp to +155 bp [4]) were basically generated according to their initial publication.

A DHII region (-9506 bp to -8767 bp relative to TSS), described to contain an estrogen responsive unit effective for *APO(a)* gene expression [5] was cut out of the 10kb-PLG PCR product with KpnI and EcoRI and ligated into the pBSK(+) vector (pBSK-DHII). pBSK-DHII was used as source for generating pGL4.10 (pGL4.10-DHII), pGL4.10-DHII-Crystallin (chicken δ -crystallin; original plasmid kindly provided by Dr. H. Sasaki, Osaka University, Osaka, Japan) and pGL4.10-DHII-0.1kb-PLG. pGL4.10-DHII-0.1kb-PLG as well as pGL4.10-0.3kb-PLG were digested with EcoRI and HindIII, respectively, followed by blunt end generation and digestion with BglII. The resulting 446 bp fragment representing the 0.3kb-PLG region and the 4.947 bp pGL4.10-DHII portion were ligated to yield pGL4.10-DHII-0.3kb-PLG.

ERE enhancer constructs were cloned as follows: Synthetic 5'-phosphorylated oligonucleotides corresponding to 25 base pairs around the SmaI restriction site at positions -11,502 [ERE(-11.5kb)] and around the intron 1/exon 2 boundary at position 4,263 [ERE(+4.2kb)] were used to introduce small double stranded DNA fragments bearing putative ERE sequences in front of selected promoter constructs. Oligonucleotides were ERE-11.5kb-F: 5' (PHOS)-TGA CCC CGG GGA CAA GGT GAC CAC G 3', and ERE+4.2kb-F: 5' (PHOS)-CCA CCT CTA GGT CAA GGA GAG CCT C 3' (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) and their corresponding complementary counterparts. Double stranded oligonucleotides were generated and cloned into blunt-ended restriction sites of pGL4.10-0.1kb-PLG in forward and inverse orientation [pGL4.10-ERE(-11.5kb), pGL4.10-ERE(-11.5kb)fw-0.1kb-PLG, pGL4.10-ERE(-11.5)inv-0.1kb-PLG, pGL4.10-ERE(+4.2kb)fw-0.1kb-PLG, pGL4.10-ERE(+4.2)inv-0.1kb-PLG], pGL4.10-Crystallin [pGL4.10-ERE(-11.5kb)fw-Crystallin, pGL4.10-ERE(-11.5kb)inv-Crystallin], as well as pGL4.10-DHII-0.1kb-PLG [pGL4.10-ERE(-11.5kb)fw-DHII-0.1-PLG,

pGL4.10-ERE(-11.5kb)inv-DHII-0.1-PLG]. The integrity of all constructs was verified by restriction endonuclease digestion and direct sequencing. Detailed cloning protocols can be obtained upon request.

Primary human hepatocytes. Primary human hepatocytes were isolated from liver biopsies (3 patients with gastrointestinal malignancies with liver metastases), biomaterial was kindly provided by Prof. R. Gebhardt (Institute for Biochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig, Germany) through the “HepatoSys” program according to the guidelines of the „Charitable state controlled foundation HTCR (Human Tissue and Cell Research)“ with written informed consent of patients [20]. Cells were cultured as described previously [21]. After 6 h starving, cells were stimulated with 100 nM E2 in Williams Medium E without phenol red with 5% charcoal/dextran treated FCS and 1% Glutamine. 24 h later, cells were harvested and total RNA was isolated using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Real time PCR. Human *PLG* mRNA expression was measured by quantitative real-time RT-PCR (ABI PRISM 7500 Sequence Detector; Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Briefly, 0.5 µl of 1 µg reversely transcribed total RNA were amplified in a 20 µl PCR reaction using human *PLG* specific primers, qPCR Master Mix Plus Low ROX (Eurogentec, Cologne, Germany) and an oligonucleotide FAM-5'-ACATCCCCGCTGCACAACACC-3'-TAMRA (Biomers, Ulm, Germany) as probe according to the manufacturer's instructions. 18s rRNA was used as housekeeping gene for normalization. Specific cycle conditions will be provided upon request.

4. Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmalig der Einfluss von Östrogen auf die Plg-Promotoraktivität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Östrogen die Aktivität des Plg-Promotors sowohl vermindern als auch steigern kann.

Regionen nahe der *TSS* haben unter Einfluss von Östrogen eine suppressorische Wirkung (DHII, -2,4 kb) und sind Leberzell- und Plg-Promotor spezifisch. Eine besondere Rolle spielt hierbei die Region DHII mit ihrer *ERU*. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wird vermutet, dass eine Steigerung der Transkription durch direkte *ERE-ERα* Interaktion zustande kommt, wohingegen die Verminderung der Transkription durch *ERα* über indirekte Mechanismen hervorgerufen wird, wie zum Beispiel Bindung und Rekrutierung von *Sp1* und *AP-1*. Im proximalen Bereich des Plg-Promotors finden sich *Sp1* und *AP-1* Bindungsstellen, deren Vorhandensein den transkriptionsvermindernden Effekt von Östrogen vermittelt durch diese Sequenzabschnitte erklären könnte (Kida et al., 1997; Lin et al., 2007). Die Region DHII enthält außerdem zwei Bindungsstellen für *PPARα* (Wade et al., 1997). Für den Apo(a)-Promotor konnte durch *PPARα* eine Aufhebung des hemmenden Östrogeneffektes auf die DHII gezeigt werden, auch wurde eine direkte Bindung von *PPARα* an die entsprechende *ERU* demonstriert und eine Konkurrenz des *ERα* und des *PPARα* Rezeptors um Bindungsstellen des *ERU* genannt (Puckey et al., 2002). Diese auf das Apo(a)-Gen (Boffelli et al., 1999) beschriebene Wirkung der DHII konnte ich für das Plg-Gen zeigen, womit die *PPARα* vermittelten Effekte auch für den Plg-Promotor angenommen werden kann, aber noch nachgewiesen werden sollte.

Die Interaktion zwischen *PPARα* und der Plg-Transkriptionskontrolle zu untersuchen erscheint bedeutsam, da die Medikamentengruppe der Fibrate (Lipid senkende Medikamente) Liganden des *PPARα* sind und somit einen weiteren kausalen Ansatz zur Behandlung von Typ I Plg-Mangel, insbesondere bei männlichen oder minderjährige Patienten, darstellen könnte.

In dieser Arbeit wurden innerhalb der Plg-Promotorregion zwei *EREs* identifiziert (-11,5 kb und +4,3 kb relativ zur *TSS*) die eine starke Transkriptionsaktivierung durch Östrogen vermitteln. Diese konnte im Gegensatz zur Regulation der DHII auch in anderen Zelllinien nachgewiesen werden, wenngleich auch nicht im selben Ausmaß wie in HepG2 Zellen. Somit scheinen diese *EREs* starke Enhancer zu sein, weisen jedoch eine deutlich höhere Stimulierbarkeit in HepG2 auf, was auf weitere leberspezifische Effekte und zusätzliche Interaktionen hindeutet. Um die physischen Interaktionen zwischen *ERα* und *ERE -11,5 kb* auf der Ebene endogener, chromosomaler DNA zu untersuchen, wurde ein Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) Assay durchgeführt, dessen Etablierung jedoch nicht nachhaltig gelang. Ein Nachweis der unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen (Klinge et al., 2000; Krieg et al., 2004) sehr wahrscheinlich anzunehmenden, direkten DNA-Rezeptor Bindung steht somit noch aus und sollte in weiterführenden Untersuchungen für das Konstrukt *ERE -11,5 kb* durchgeführt werden.

Eine Analyse der endogenen Plg-Expression in humanem Gewebe wäre aufgrund der teils gegensätzlichen Regulation des Plg-Promotors wünschenswert. Hier mangelt es jedoch an einem geeigneten Zellmodell, da immortalisierte Zelllinien zumeist nicht Plg- und *hERα* Expression vereinen. Die hier verwendete primäre Leberzellkultur ließ sich jedoch erwartungsgemäß nur unzureichend transfizieren (Transfektionseffizienz $\leq 20\%$), wodurch eine *in vitro* Analyse der Plg-Expression nicht möglich war. Eine Entnahme von gesundem, humanen Lebergewebe ist aus medizinischen und ethischen Gründen nicht möglich. Daher wurde in den hier beschriebenen Versuchen auf Gewebe aus geplanten Operationen an Patienten mit gastrointestinalen Tumoren mit Leberbeteiligung zurückgegriffen. Es kann somit nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden, dass ausschließlich gesundes Lebergewebe analysiert wurde, da es sich bei den zur Verfügung gestellten Materialien um die Ränder von Metastasenresektaten handelte. Des Weiteren handelte es sich zumeist um postmenopausale Patientinnen mit Dauermedikation und chronischen Erkrankungen, die möglicherweise auch die Östrogen-Rezeptorexpression und den Leberstoffwechsel an sich beeinflussten (Kalra *et al.*, 2008).

Als Teil oraler Kontrazeptiva und ihrer beschriebenen Wirkung auf die Symptomatik des Typ I Plg-Mangels sollte auch der Einfluss von Gestagen auf die Plg-Expression diskutiert und untersucht werden. In der Literatur sind sowohl stimulierende, als auch hemmende oder gar keine Effekte (Badimon *et al.*, 1999) bei der Verabreichung eines reinen Gestagen-haltigen oralen Kontrazeptivums beschrieben. Es wird postuliert, dass die meisten Effekte auf das fibrinolytische System durch Östrogen vermittelt werden und der Progesteronanteil diese Effekte lediglich modifiziert (Norris *et al.*, 1997). Dies scheint durch eine Gestagen gesteuerte Hochregulation der Östrogenrezeptorexpression zu erfolgen (Rabe *et al.*, 2000).

Weiterhin wäre der Einfluss von Testosteron zu betrachten. So wurde beispielsweise beschrieben, dass das Testosteronderivat Danazol die Fibrinolyse fördert und einen Plg Anstieg verursachen kann (Sheperd 1995). Ein Anstieg von Plg-Antigen und Plg-Aktivität wurde auch nach Verabreichung des Testosteronderivates Stanozolol beobachtet (Mannucci *et al.*, 1986).

Für das *tissue-type plasminogen activator*-Gen wurde ein Multihormon-Enhancer-Element beschrieben (Bulens *et al.*, 1997), es ist denkbar, dass auch das Plg-Gen durch ein ähnliches Element reguliert werden kann.

Die Untersuchung des Einflusses der aufgezählten Substanzen könnte somit den Patienten mit Typ I Plg-Mangel helfen, die eben nicht durch Östrogenhaltige Medikamente dauerhaft behandelt werden können.

5. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr.med.

„Einfluss von Östrogen auf die Plasminogen Promotoraktivität“

eingereicht von Louise Kobelt

angefertigt an der Universität Leipzig, Universitätsklinik für Kinder und Jugendliche

betreut von Prof. Dr.med. Volker Schuster, Dr.rer.nat. Jürgen Klammt, Dr.rer.nat. Katrin Tefs

Mai 2016

Plasminogen (Plg) ist ein essentielles Protein der Fibrinolyse und sorgt außerdem für das regelgerechte Ausheilen einer Wunde. Der Typ I Plg-Mangel ist eine seltene Multisystemerkrankung mit einer gestörten extravaskulären Fibrinolyse, die zur Ausbildung fibrinreicher Pseudomembranen auf den Schleimhäuten des Körpers führt, wobei die Conjunktivitis lignosa die häufigste Manifestationsform ist. Die Lebensqualität und auch die Lebenserwartung betroffener Patienten sind zum Teil stark eingeschränkt. Kausale Therapien existieren nicht, in einer Fallserie wurde jedoch eine Besserung der klinischen Symptomatik und eine Erhöhung der im Blut messbaren Plg-Konzentration und Aktivität bei drei Patientinnen unter Einnahme oraler Kontrazeptiva beschrieben. Östrogen wirkt im Körper über Rezeptoren durch Beeinflussung der Genexpression an bestimmten regulatorischen Elementen im Bereich der Promotoren (*Estrogen responsive Elements (EREs)* oder auch *Estrogen Responsive Units (ERUs)*). Die regulatorischen Elemente befinden sich zu einem Großteil im Bereich der Promotoren regulierter Gene.

Ziel der Arbeit war es, den Plg-Promotor auf seine Regulierbarkeit durch Östrogen zu untersuchen und die dafür verantwortlichen regulatorischen Elemente zu identifizieren und zu charakterisieren. Im nächsten Schritt sollten die Ergebnisse aus den Promotoranalysen auf Proteinebene reproduziert und verifiziert werden um die gewonnen Erkenntnisse in eine mögliche systemische Behandlung von Patienten mit Typ I Plg-Mangel einfließen zu lassen.

Methodisch wurden zunächst Plg-Promotoren unterschiedlicher Länge in einen Reportervektor kloniert, anschließend in HepG2 Zellen transfiziert und mit Östrogen stimuliert. Anschließend erfolgte die Analyse der Promotoraktivität mittels *Dual Luciferase Reporter Assay*. Durch Literaturrecherche wurde die Promotorregion DHII als mögliches regulatorisches Element identifiziert und anschließend

kloniert und analysiert. Weiterhin gelang die *in silico* Identifizierung zweier *EREs*, die sich *-11,5 kb* und *+4,2 kb* relativ zur Plg-TSS befanden. Auch diese wurden vor verschiedene Plg-Promotorelemente kloniert und anschließend analysiert.

Als Zellmodell für die Überprüfung der endogenen Plg-Genexpression wurden primäre menschliche Hepatozyten kultiviert, mit Östrogen stimuliert und die mRNA Expression anschließend mittels *Real-Time-PCR* ermittelt.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Die Plg-Promotoraktivität kann durch Östrogen reguliert werden: Proximal zur TSS gelegene Östrogen sensitive Elemente wirken repressorisch (DHII, *-2,4 kb*), weit distal gelegene Enhancer Elemente (*ERE -11,5 kb*, *ERE +4,2 kb*) bewirken eine starke Stimulation.
2. Für die Repression der Plg-Promotoraktivität konnte hier die Region DHII mit einer *ERU* identifiziert werden, eine weitere Rolle scheint eine *AP-3* Bindungsstelle bei *-2,4 kb* relativ zur Plg-TSS zu spielen. Beide Enhancer sind Leber- und Plg-Gen-spezifisch.
3. Für eine Stimulation der Plg-Promotoraktivität konnten erstmals das *ERE -11,5 kb* und das *ERE +4,2 kb* identifiziert werden.
4. Der Nachweis des Effektes von Östrogen auf die endogene Plg-Expression konnte aufgrund methodischer Einschränkungen (Unvereinbarkeit von gleichzeitiger *hERα* und Plg Expression, Gewebe aus Metastasenresektaten) nicht geführt werden.

Die hier vorliegende Arbeit stützt auf molekularer Ebene die phänomenologischen Beschreibungen von Sartori *et al.* 2003 über einen erhöhten Plg-Plasmaspiegel und Besserung der klinischen Symptomatik eines Typ I Plg-Mangels unter dem Einfluss von Östrogen. Die Regulation spielt sich dabei auf der Promotorebene ab. Aufgrund der gegensätzlichen Ergebnisse aus den Reporterassays erscheinen Analysen möglicher Interaktionen zwischen den identifizierten Enhancerelementen und dem Östrogenrezeptor oder auch bisher noch nicht identifizierten co-regulatorischen Elementen sinnvoll.

Außerdem deuten die Erkenntnisse aus dieser Arbeit darauf hin, dass weitere, möglicherweise die Plg-Sekretion modifizierende Substanzen, wie z.B. Gestagen, Testosteron und Substrate des PPARα Rezeptors vielversprechende Ansätze in der Behandlung des Typ I Plg-Mangels darstellen könnten.

6. Literaturverzeichnis

Adrian GS, Korinek BW, Bowman BH, Yang F. The human transferrin gene: 5' region contains conserved sequences which match the control elements regulated by heavy metals, glucocorticoids and acute phase reaction. *Gene*. 1986;49(2):167-75.

Anolik JH, Klinge CM, Brolly CL, Bambara RA, Hilf R. Stability of the ligand-estrogen receptor interaction depends on estrogen response element flanking sequences and cellular factors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1996 Dec;59(5-6):413-29.

Badimon L, Bayés-Genís A. Effects of progestogens on thrombosis and atherosclerosis. *Hum Reprod Update*. 1999 May-Jun;5(3):191-9.

Bannach FG, Gutierrez A, Fowler BJ, Bugge TH, Degen JL, Parmer RJ, Miles LA. Localization of regulatory elements mediating constitutive and cytokine-stimulated plasminogen gene expression. *J Biol Chem*. 2002 Oct 11;277(41):38579-88.

Beekman JM, Wijnholds J, Schippers IJ, Pot W, Gruber M, Ab G. Regulatory elements and DNA-binding proteins mediating transcription from the chicken very-low-density apolipoprotein II gene. *Nucleic Acids Res*. 1991 Oct 11;19(19):5371-7.

Berry M, Nunez AM, Chambon P. Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Feb;86(4):1218-22.

Bierly JR, Blandford DL, Weeks JA, Baker RS. Ligneous Conjunctivitis As A Complication Following Strabismus Surgery. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 1994;31:99-103.

Boffelli D, Zajchowski DA, Yang Z, Lawn RM. Estrogen modulation of apolipoprotein(a) expression. Identification of a regulatory element. *J Biol Chem*. 1999 May 28;274(22):15569-74.

Bohmalk JF, Fuller GM. Plasminogen is synthesized by primary cultures of rat hepatocytes. *Science*. 1980 Jul 18;209(4454):408-10.

Bonnefoy A, Legrand C. Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase. *Thromb Res*. 2000 May 15;98(4):323-32.

Bulens F, Merchiers P, Ibañez-Tallon I, De Vriese A, Nelles L, Claessens F, Belayew A, Collen D. Identification of a multihormone responsive enhancer far upstream from the human tissue-type plasminogen activator gene. *J Biol Chem*. 1997 Jan 3;272(1):663-71.

Burrowes CE, Movat HZ, Soltay MJ. The kinin system of human plasma. VI. The action of plasmin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1971 Dec;138(3):959-66.

Caputo R, Pucci N, Mori F, Secci J, Novembre E, Frosini R. Long-term efficacy of surgical removal of pseudomembranes in a child with ligneous conjunctivitis treated with plasminogen eyedrops. *Thromb Haemost*. 2008 Dec;100(6):1196-8.

Chauvet C, Vanhoutteghem A, Duhem C, Saint-Auret G, Bois-Joyeux B, Djian P, Staels B, Danan JL. Control of gene expression by the retinoic acid-related orphan receptor alpha in HepG2 human hepatoma cells. *PLoS One*. 2011;6(7):e22545.

Chen S, Wishart M, Hiscott P. Ligneous conjunctivitis: A local manifestation of a systemic disorder? *Journal of Aapos*. 2000;4:313-315.

Cheskis BJ, Greger JG, Nagpal S, Freedman LP. Signaling by estrogens. *J Cell Physiol*. 2007 Dec;213(3):610-7.

Chi AC, Prichard E, Richardson MS, Rasenberger KP, Weathers DR, Neville BW. Pseudomembranous disease (ligneous inflammation) of the female genital tract, peritoneum, gingiva, and paranasal sinuses associated with plasminogen deficiency. *Ann Diagn Pathol*. 2009 Apr;13(2):132-9.

Collen D. Natural inhibitors of fibrinolysis. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 1980;14:24-30.

Danø K, Andreasen PA, Grøndahl-Hansen J, Kristensen P, Nielsen LS, Skriver L. Plasminogen activators, tissue degradation, and cancer. *Adv Cancer Res*. 1985;44:139-266.

De Cock R, Ficker LA, Dart JG, Garner A, Wright P. Topical heparin in the treatment of ligneous conjunctivitis. *Ophthalmology*. 1995;102:1654-1659.

Driscoll, M.D et al. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:29321–29330.

Fowlkes DM, Mullis NT, Comeau CM, Crabtree GR. Potential basis for regulation of the coordinately expressed fibrinogen genes: homology in the 5' flanking regions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Apr;81(8):2313-6.

Gross JL, Moscatelli D, Rifkin DB Increased capillary endothelial cell protease activity in response to angiogenic stimuli in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 May;80(9):2623-7.

Hamilton KK, Fretto LJ, Grierson DS, McKee PA. Effects of plasmin on von Willebrand factor multimers. Degradation in vitro and stimulation of release in vivo. *J Clin Invest.* 1985 Jul;76(1):261-70.

Hanbücken FW, Schneider J, Günzler WA, Friderichs E, Giertz H, Flohé L. Selective fibrinolytic activity of recombinant non-glycosylated human pro-urokinase (single-chain urokinase-type plasminogen activator) from bacteria. *Arzneimittelforschung.* 1987 Aug;37(8):993-7.

Heidemann DG, Williams GA, Hartzler M, Ohanian A, Citron ME. Treatment of ligneous conjunctivitis with topical plasmin and topical plasminogen. *Cornea.* 2003 Nov;22(8):760-2.

Jenkins GR, Seiffert D, Parmer RJ, Miles LA. Regulation of plasminogen gene expression by interleukin-6. *Blood.* 1997 Apr 1;89(7):2394-403.

Juranić Z, Tomin R, Spuzić I. Considerations on the role of the plasminogen activators/plasmin system in the generation of conditions for more efficient interaction of malignant cells with large granular lymphocytes. *Res Immunol.* 1989 Mar-Apr;140(3):281-3.

Kalra M, Mayes J, Assefa S, Kaul AK, Kaul R. Role of sex steroid receptors in pathobiology of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2008 Oct 21;14(39):5945-61.

Kato S, Sasaki H, Suzawa M, Masushige S, Tora L, Chambon P, Gronemeyer H. Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors. *Mol Cell Biol.* 1995 Nov;15(11):5858-67.

Kida M, Wakabayashi S, Ichinose A. Expression and induction by IL-6 of the normal and variant genes for human plasminogen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jan 3;230(1):129-32.

Kininis M, Chen BS, Diehl AG, Isaacs GD, Zhang T, Siepel AC, Clark AG, Kraus WL. Genomic analyses of transcription factor binding, histone acetylation, and gene expression reveal mechanistically distinct classes of estrogen-regulated promoters. *Mol Cell Biol*. 2007 Jul;27(14):5090-104.

Klammt J, Kobelt L, Aktas D, Durak I, Gokbuget A, Hughes Q, Irkec M, Kurtulus I, Lapi E, Mechoulam H, Mendoza-Londono R, Palumbo JS, Steitzer H, Tabbara KF, Ozbek Z, Pucci N, Sotomayor T, Sturm M, Drogies T, Ziegler M, Schuster V. Identification of three novel plasminogen (PLG) gene mutations in a series of 23 patients with low PLG activity. *Thromb Haemost*. 2011 Mar;105(3):454-60. doi: 10.1160/TH10-04-0216. Epub 2010 Dec 21.

Klein-Hitpass, L et al. A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Res*. 1988;16: 647–663.

Klinge, C.M. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids*. 2000; 65: 227–251.

Klinge CM. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res*. 2001 Jul 15;29(14):2905-19.

Krieg AJ, Krieg SA, Ahn BS, Shapiro DJ. Interplay between estrogen response element sequence and ligands controls in vivo binding of estrogen receptor to regulated genes. *J Biol Chem*. 2004 Feb 6;279(6):5025-34.

Lee MO, Liu Y, Zhang XK. A retinoic acid response element that overlaps an estrogen response element mediates multihormonal sensitivity in transcriptional activation of the lactoferrin gene. *Mol Cell Biol*. 1995 Aug;15(8):4194-207.

Li A, Wun TC. Proteolysis of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) by plasmin: effect on TFPI activity. *Thromb Haemost*. 1998 Sep;80(3):423-7.

Lijnen HR. Role of the fibrinolytic and matrix metalloproteinase systems in arterial neointima formation after vascular injury. *Verh K Acad Geneesk Belg*. 2001;63(6):605-22.

Lin CY, Vega VB, Thomsen JS, Zhang T, Kong SL, Xie M, Chiu KP, Lipovich L, Barnett DH, Stossi F, Yeo A, George J, Kuznetsov VA, Lee YK, Charn TH, Palanisamy N, Miller LD, Cheung E, Katzenellenbogen BS, Ruan Y, Bourque G, Wei CL, Liu ET. Whole-genome cartography of estrogen receptor alpha binding sites. *PLoS Genet.* 2007 Jun;3(6):e87.

Magnaghi P, Mihalich A, Taramelli R. Several liver specific DNase hypersensitive sites are present in the intergenic region separating human plasminogen and apoprotein(A) genes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Nov 30;205(1):930-5.

Maeda N. Nucleotide sequence of the haptoglobin and haptoglobin-related gene pair. *J Biol Chem.* 1985 Jun 10;260(11):6698-709.

Mak TW, Rutledge G, Sutherland DJ. Androgen-dependent fibrinolytic activity in a murine mammary carcinoma (Shionogi SC-115 cells) in vitro. *Cell.* 1976 Feb;7(2):223-6.

Malgaretti N, Acquati F, Magnaghi P, Bruno L, Pontoglio M, Rocchi M, Saccone S, Della Valle G, D'Urso M, LePaslier D, et al. Characterization by yeast artificial chromosome cloning of the linked apolipoprotein(a) and plasminogen genes and identification of the apolipoprotein(a) 5' flanking region. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 1;89(23):11584-8.

Mannucci PM, Kluft C, Traas DW, Seveso P, D'Angelo A. Congenital plasminogen deficiency associated with venous thromboembolism: therapeutic trial with stanozolol. *Br J Haematol.* 1986 Aug;63(4):753-9.

Mao SS, Cooper CM, Wood T, Shafer JA, Gardell SJ. Characterization of plasmin-mediated activation of plasma procarboxypeptidase B. Modulation by glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 1999 Dec 3;274(49):35046-52.

McKee PA, Andersen JC, Switzer ME. Molecular structural studies of human factor VIII. *Ann N Y Acad Sci.* 1975 Jan 20;240:8-33.

Meroni G, Buraggi G, Mantovani R, Taramelli R. Motifs resembling hepatocyte nuclear factor 1 and activator protein 3 mediate the tissue specificity of the human plasminogen gene. *Eur J Biochem.* 1996 Mar 1;236(2):373-82.

Mueck AO, Seeger H. Biochemical markers surrogating on vascular effects of sex steroid hormones. *Gynecol Endocrinol*. 2006 Mar;22(3):163-73.

Murray JC, Buetow KH, Donovan M, Hornung S, Motulsky AG, Distech C, Dyer K, Swisshelm K, Anderson J, Giblett E, et al. Linkage disequilibrium of plasminogen polymorphisms and assignment of the gene to human chromosome 6q26-6q27. *Am J Hum Genet*. 1987 Apr;40(4):338-50.

Nielsen LS, Kellerman GM, Behrendt N, Picone R, Danø K, Blasi F. A 55,000-60,000 Mr receptor protein for urokinase-type plasminogen activator. Identification in human tumor cell lines and partial purification. *J Biol Chem*. 1988 Feb 15;263(5):2358-63.

Norris LA, Bonnar J. Haemostatic changes and the oral contraceptive pill. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1997 Sep;11(3):545-64.

Ossowski L, Reich E. Antibodies to plasminogen activator inhibit human tumor metastasis. *Cell*. 1983 Dec;35(3 Pt 2):611-9.

Petersen TE, Martzen MR, Ichinose A, Davie EW. Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *J Biol Chem*. 1990 Apr 15;265(11):6104-11.

Puckey LH, Knight BL. Interaction of oestrogen and peroxisome proliferator-activated receptors with apolipoprotein(a) gene enhancers. *Biochem J*. 2002 Aug 15;366(Pt 1):157-63.

Rabe T, Bohlmann MK, Rehberger-Schneider S, Prifti S. Induction of estrogen receptor-alpha and -beta activities by synthetic progestins. *Gynecol Endocrinol*. 2000 Apr;14(2):118-26.

Rao SK, Biswas J, Rajagopal R, Sitalakshmi G, Padmanabhan P. Ligneous Conjunctivitis: A Clinicopathologic Study of 3 Cases. *Int Ophthalmol*. 1998;22:201-206.

Richard S, Zingg HH. The human oxytocin gene promoter is regulated by estrogens. *J Biol Chem*. 1990 Apr 15;265(11):6098-103.

Rodríguez-Ares MT, Abdulkader I, Blanco A, Touriño-Peralba R, Ruiz-Ponte C, Vega A, Cameselle-Teijeiro J. Ligneous conjunctivitis: a clinicopathological, immunohistochemical, and genetic study

including the treatment of two sisters with multiorgan involvement. *Virchows Arch.* 2007 Oct;451(4):815-21.

Tchaikovski SN, Rosing J. Mechanisms of estrogen-induced venous thromboembolism. *Thromb Res.* 2010 Jul;126(1):5-11.

Sartori TM, Saggiorato G, Pellati D, Casonato A, Spiezia L, Pontara E, Gavasso S, Girolami A. Contraceptive pills induce an improvement in congenital hypoplasminogenemia in two unrelated patients with ligneous conjunctivitis. *Thromb Haemost.* 2003 Jul;90(1):86-91.

Schäfer BM, Maier K, Eickhoff U, Todd RF, Kramer MD. Plasminogen activation in healing human wounds. *Am J Pathol.* 1994 Jun;144(6):1269-80.

Schott D, Dempfle CE, Beck P, Liermann A, Mohr-Pennert A, Goldner M, Mehlem P, Azuma H, Schuster V, Mingers AM, Schwarz HP, Kramer MD. Therapy with a purified plasminogen concentrate in an infant with ligneous conjunctivitis and homozygous plasminogen deficiency. *N Engl J Med.* 1998 Dec 3;339(23):1679-86.

Schuster V, Seregard S. Ligneous conjunctivitis. *Surv Ophthalmol.* 2003 Jul-Aug;48(4):369-88.

Schuster V, Hügler B, Tefs K. Plasminogen deficiency. *J Thromb Haemost.* 2007 Dec;5(12):2315-22.

Shafer JA, Higgins DL. Human fibrinogen. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1988;26(1):1-41.

Shepherd J. Danazol and plasma lipoprotein metabolism. *Int J Gynaecol Obstet.* 1995 Sep;50 Suppl 1:S23-6.

Strickland S, Reich E, Sherman MI. Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell.* 1976 Oct;9(2):231-40.

Tait RC, Walker ID, Conkie JA, Islam SI, McCall F. Isolated familial plasminogen deficiency may not be a risk factor for thrombosis. *Thromb Haemost.* 1996;76:1004-1008.

Tateno T, Ichinose A. Expression of plasminogen-related gene B varies among normal tissues and increases in cancer tissues. FEBS Lett. 1999 Feb 19;445(1):31-5.

Tefs K, Gueorguieva M, Klammt J, Allen CM, Aktas D, Anlar FY, Aydogdu SD, Brown D, Ciftci E, Contarini P, Dempfle CE, Dostalek M, Eisert S, Gökbuget A, Günhan O, Hidayat AA, Hügler B, Isikoglu M, Irkeç M, Joss SK, Klebe S, Kneppo C, Kurtulus I, Mehta RP, Ornek K, Schneppenheim R, Seregard S, Sweeney E, Turtschi S, Veres G, Zeitler P, Ziegler M, Schuster V. Molecular and clinical spectrum of type I plasminogen deficiency: A series of 50 patients. Blood. 2006 Nov 1;108(9):3021-6. Epub 2006 Jul 18.

Twining SS, Wilson PM, Ngamkitidechakul C. Extrahepatic synthesis of plasminogen in the human cornea is up-regulated by interleukins-1alpha and -1beta. Biochem J. 1999 May 1;339 (Pt 3):705-12.

Wade DP, Puckey LH, Knight BL, Acquati F, Mihalich A, Taramelli R. Characterization of multiple enhancer regions upstream of the apolipoprotein(a) gene. J Biol Chem. 1997 Nov 28;272(48):30387-99.

Waisman DM. Plasminogen. Structure, Activation and Regulation. Kluwer Academic Verlag. 2003. Seite 75-76.

Zeibdawi AR, Prydzial EL. Mechanism of factor Va inactivation by plasmin. Loss of A2 and A3 domains from a Ca²⁺-dependent complex of fragments bound to phospholipid. J Biol Chem. 2001 Jun 8;276(23):19929-36.

Zhang L, Seiffert D, Fowler BJ, Jenkins GR, Thinnes TC, Loskutoff DJ, Parmer RJ, Miles LA. Plasminogen has a broad extrahepatic distribution. Thromb Haemost. 2002 Mar;87(3):493-501.

III Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig,

Unterschrift

IV Curriculum vitae

Louise Kobelt, geboren am 13.01.1985 in Karl-Marx Stadt

Schulische Ausbildung:

1991-1991	Pablo-Neruda-Schule, Chemnitz (Grundschule)
1991-1995	Johann Gottlieb Fichte Schule, Mittweida (Grundschule)
1995-2003	Städtisches Gymnasium Mittweida (Abschluss: Abitur, Note 1.1)

Medizinische Ausbildung:

10/ 2003	Beginn Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
09/ 2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2.0)
12/ 2010	Abschluss des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (Note 1,6), Approbation als Ärztin
02/ 2011	Assistenzärztin Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche Leipzig
01/ 2014	Mitarbeit AG pädiatrische Pneumologie und Allergologie Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendliche Leipzig
04/2015-05/2016	Elternzeit

Dissertation:

02/2006	experimentelle Doktorarbeit an der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche Leipzig, AG Professor Schuster
07/2007	Promotionsförderung durch die Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

V Liste der Veröffentlichungen

Tefs K, **Kobelt L**, Ziegler M, Hügler B, Schuster V.

Difficulties in mutation screening of the plasminogen (PLG) gene in patients with ligneous conjunctivitis and severe hypoplasminogenemia.

Arch Ophthalmol. 2007 Sep;125(9):1303; author reply 1303.

Klammt J, **Kobelt L**, Aktas D, Durak I, Gokbuget A, Hughes Q, Irkec M, Kurtulus I, Lapi E, Mechoulam H, Mendoza-Londono R, Palumbo JS, Steitzer H, Tabbara KF, Ozbek Z, Pucci N, Sotomayor T, Sturm M, Drogies T, Ziegler M, Schuster V.

Identification of three novel plasminogen (PLG) gene mutations in a series of 23 patients with low PLG activity.

Thromb Haemost. 2011 Mar;105(3):454-60.

Tefs K, Ott-Gueorguieva M, **Kobelt L**, Ziegler M, Hintze C, Hügler B, Schuster V.

Isoelectric focusing pattern of plasminogen mutants of patients with hypoplasminogenemia: correlation of in-vitro data with computer-predicted isoelectric points (pI).

Blood Coagul Fibrinolysis. 2011 Sep;22(6):499-505.

Kobelt L, Klammt J, Tefs K, Schuster V.

Estrogen modulates plasminogen promoter activity.

Biochem Biophys Res Commun. 2013 Aug 16;438(1):110-5.

Kobelt L, Dittrich K, Schuster V.

Is the B6.129P2-Plg transgenic mouse an adequate treatment model for patients with ligneous conjunctivitis?

Pharmacol Res. 2013 Dec;78:10.

Gerlach MM, Lippmann N, **Kobelt L**, Petzold-Quinque S, Ritter L, Kiess W, Siekmeyer M.

Possible pulmonary *Rhizopus oryzae* infection in a previously healthy child after a near-drowning incident.

Infection. 2015 Sep 13. [Epub ahead of print]

VI Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die durch ihre Hilfe zur Realisierung dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation an der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche Leipzig und die Benutzung des Forschungslabores möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Kiess bedanken.

Für die Überlassung des Themas und der persönlichen Unterstützung bei der Bearbeitung der Aufgabenstellungen danke ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Schuster.

Ein großer Dank gebührt Dr. Jürgen Klammt für seine engagierte Betreuung und hilfreiche Diskussion. Frau Dr. Katrin Tefs hat mir die Arbeit durch konstruktive Hinweise erleichtert.

Allen Mitarbeitern des Forschungslabores der Kinderklinik gilt mein Dank für die Einarbeitung und dass mir allzeit alle mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke meinen Eltern, dass sie mir das zusätzliche Forschungsjahr ermöglichten und mit Humor und Geduld die Fertigstellung der Arbeit erwartet haben.

Ich danke Thomas Frese, der mit Geduld und konstruktiver Kritik die Fertigstellung der Arbeit maßgeblich beeinflusst hat. Danke.